

高速液体クロマトグラフィーによる生体微量成分の 分離分析に関する研究

著者	長谷川 正年
号	212
発行年	1981
URL	http://hdl.handle.net/10097/15824

氏 名 (本籍)	は せ がわ まさ とし 長 谷 川 正 年
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 第 2 1 2 号
学位授与年月日	昭和 5 7 年 3 月 1 0 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目	高速液体クロマトグラフィーによる生体 微量成分の分離分析に関する研究
-------------	---------------------------------------

(主 査)

論文審査委員 教授 南 原 利 夫 教授 長 哲 郎

教授 高 野 誠 一

論 文 内 容 要 旨

抱合型ステロイドは生体内に広く存在し、近年その生理的意義が注目されている。これらは一般に水溶性であるうえ、化学的並びに物理的性質が相互に酷似するため分離定量の困難な場合が多い。また近年医薬品の有効性と安全性の観点から投与薬物の体内動態を明らかにすることが必要とされ、信頼度の高い体液中濃度測定法の確立が求められている。薬物には光学対掌体の一方が他方に比しつよい薬理作用を示すにもかかわらず光学分割が生産規模では困難なことからラセミ体として臨床に提供されている例が少なくない。そのため薬理作用を代表する光学異性体の体内動態を正確に把握することが重要な課題となっている。

一方、1969年Kirkland らにより開発された高速液体クロマトグラフィー (HPLC) はこの10年余年間に充てん剤のみならず高圧ポンプ、高感度検出器等の開発改良がなされ、著しい発展をとげるにいたっている。HPLCはその原理からみて極性化合物、高分子化合物など難揮発性あるいは熱安定性に乏しい化合物の分離分析手段に有利である。そこでこのHPLCを用い、分離、定量が困難とされている抱合型ステロイドとして強心性ステロイドおよび胆汁酸を、また光学活性薬物のモデル化合物としてアミノ酸をとりあげ分析化学的観点から検討を行った。

まずはじめに日本産ガマ (*Bufo vulgaris formosus* Boulenger) の耳下腺分泌物 (毒液) に含まれる遊離型 (bufogenin) 並びに抱合型強心性ステロイド (bufotoxin 類) の分離定量を企て、標品を用いた分析の諸条件を吟味するとともに化学構造と保持値の関係についても考察を加えた。

ついで上述の検討結果を活かし、逆相型HPLCを用い遊離型、グリシン並びにタウリン抱合型胆汁酸15種を一斉に分離定量し得る条件を吟味し、さらにヒト胆汁試料への適用を試みた。

最後に光学活性化化合物の分離試薬として α -methoxy- α -methyl-naphthaleneacetic acid 2種および光学活性テルペンisothiocyanate 2種を合成し、アミノ酸をモデル化合物としてこれら分離試薬の有用性を吟味した。

1. 日本産ガマ毒液に含まれる強心性ステロイドの分析

1) 遊離型強心性ステロイド

まずbufadienolide 16種およびcardenolide 8種をとりあげ、順相型および逆相型カラムを用いて分離の様相を検討した。その結果、bufadienolide、cardenolideともカラムに逆相型の μ -Bondapak C₁₈を、移動相にMeOH/H₂O、THF/H₂OおよびCH₃CN/H₂Oを用いるとき比保持値も小さく ($k' < 5 \sim 6$)、それらを一斉に分離し得ることが判明した。

ステロイド核上の各種官能基が保持値におよぼす寄与は逆相型の μ -Bondapak C₁₈カラムを用いたとき、Table 1 に掲げたごとくであった。因みに、順相型カラムを用いた場合これら官能基の寄

与は必ずしも逆相型の逆の順序とはならなかった。これらの知見は構造解析の一助として役立つものと思われる。

Table I. Retention Time Contribution for Functional Groups ^{a)}

Functional group	Bufadienolide		Cardenolide	
	1	2	1	2 ^{b)}
5 β -OH	-0.14	0.40		
11 α -OH	-0.34	0.42	-0.34	0.50
12 β -OH			-0.27	0.44
16 β -OH	-0.21	0.47	-0.15	0.47
16 β -OAc	-0.14	0.13		
14 α , 15 α -Epoxy			0.01	0.03
14 β , 15 β -Epoxy			0.04	0.11

a) Figures represent the logarithm of retention time relative to an internal standard (IS). Bufalin and digitoxigenin were employed as IS for bufadienolides and cardenolides, respectively.

b) Conditions used were as follows: 1) μ -Bondapak C₁₈ column, methanol/water (2:1), 1 ml/min; 2) μ -Porasil column, hexane/tetrahydrofuran (3:2), 2 ml/min.

ついでこれらの結果をもとに日本産ガマ毒液に含まれる bufogenin の検索を行い, bufogenin 13 種を同定した。また主 bufogenin を定量し, 日本産ガマ毒液には arenobufagin が最も多く含まれることも明らかにした。

2) 抱合型強心性ステロイド

ガマに存在する主な抱合型強心性ステロイドとしては bufotoxin 類〔 bufogenin 3-suberoyl-arginine ester およびその homolog (1) 〕, bufogenin 3-dicarboxylic acid half ester (2) および bufogenin 3-sulfate (3) が知られている (Chart 1)。まず bufotoxin 類の分離条件を検討し, μ -Bondapak C₁₈ をカラムに, MeOH/H₂O および THF/H₂O を移動相に用いるとき満足し得

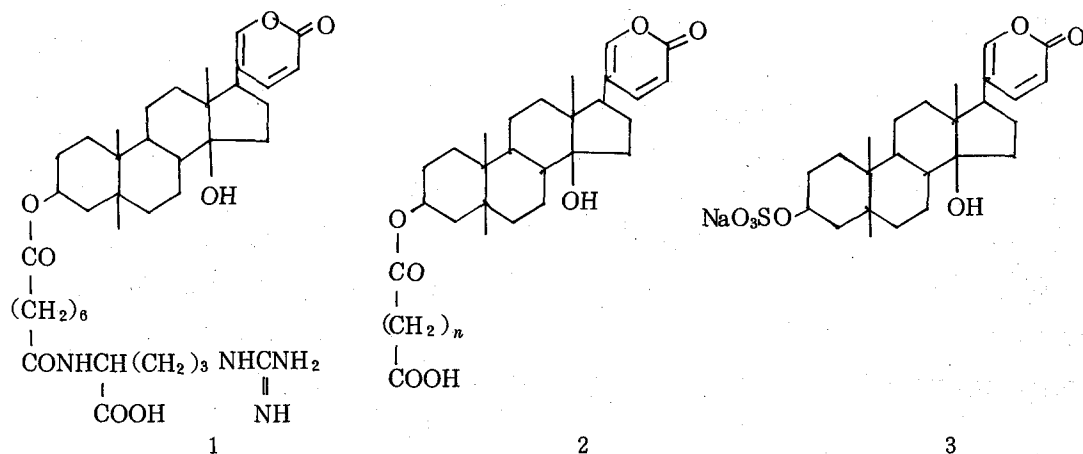


Chart 1

る結果が得られた。これらbufotoxin類の溶出順、分離の難易は対応するbufogeninのそれとはほぼ同様であり、homologのメチレン数と相対保持時間の間には良好な直線性が認められた。

これらの知見をもとにしてガン毒液に含まれるbufotoxin類を精査し、それら20種を同定した。

またbufogenin 3-dicarboxylic acid half esterおよびbufogenin 3-sulfateにも同じカラムを用いたが、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ を少量添加した移動相は分離に有効なことがわかった。

2. ヒト胆汁中胆汁酸の分析

遊離型並びに抱合型胆汁酸15種についてHPLCによる分離の諸条件を吟味した。その結果、カラムに μ -Bondapak C_{18} を、移動相に0.3%炭酸アンモニウム (pH 7.6) / アセトニトリルを用いるとcholate, ursodeoxycholate, chenodeoxycholate, deoxycholateおよびlithocholateの5者を遊離型、グリシンおよびタウリン抱合型の各画分ごとに分離し得ることが判明した。このときそれぞれの胆汁酸は抱合形式が異ってもほぼ同一の k' 値を示し (Table II), 保持値はステロイド核上の水酸基の数, 位置, 立体配置に依存することが示唆された。

Table II Capacity Ratios of Free and Conjugated Bile Acids

Compound	Free		Glycoconjugate		Tauroconjugate	
	A	B	A	B	A	B
Cholate	1.2	2.7	1.2	2.7	1.2	2.7
Ursodeoxycholate	1.2	3.0	1.2	3.0	1.1	3.0
Chenodeoxycholate	2.9	—	2.9	—	3.3	—
Deoxycholate	3.6	—	3.6	—	4.1	—
Lithocholate	12.3	—	11.4	—	13.6	—
	(1.2 min)★		(1.2 min)★			

Conditions: 1 ft. x 1/4 in. I. D. column; detector, Model R 401 differential refractometer; mobile phase, 0.3% ammonium carbonate-acetonitrile, (A) 9:4, (B) 11:4; 2 ml/min.

★ The figures in parentheses represents the k' values.

つぎにヒト胆汁試料への応用を目的としてTLCによる遊離型、グリシンおよびタウリン抱合型の3分画法を検討した。しかし、この方法は分離と回収率に問題があるため、市販のSephadex LH-20に疎水性基とイオン交換基を導入したpiperidinoxypropyl Sephadex LH-20 (PHP-LH-20)を開発し、これを用いるイオン交換クロマトグラフィーにより遊離型、グリシンおよびタウリン抱合型胆汁酸を階段的に3分画することを試みた (Fig. 1)。

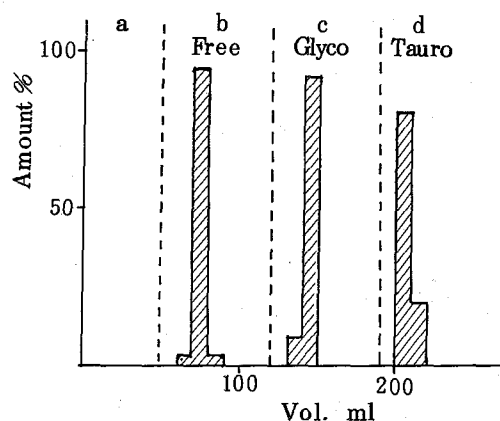


Fig. 1. Group separation of bile acids by ion-exchange chromatography on PHP-LH-20. Eluent: (a) 90% ethanol, (b) 0.1M acetic acid in 90% ethanol, (c) 0.2 M formic acid in 90% ethanol, (d) 0.3 M acetic acid-potassium acetate in 90% ethanol.

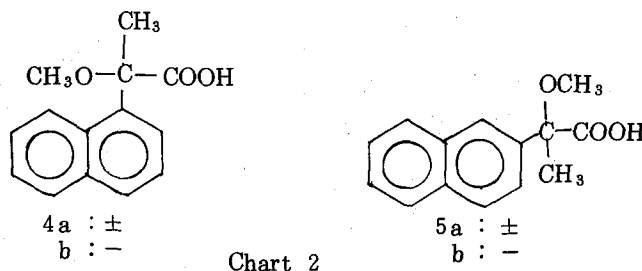
以上の結果、ヒト胆汁試料をAmberlite XAD-2樹脂を用いる固相抽出法でクリーンアップしたのち、PHP-LH-20で3分画し、各画分をHPLCに付すことにより遊離型、グリシン並びにタウリン抱合型胆汁酸15種を一斉に分離定量する方法がはじめて完成された。

さらに本法を胆石症患者10名の胆汁試料に応用し、グリシン並びにタウリン抱合型胆汁酸の一斉分析を行った。

3. アミノ酸光学異性体の分析

1) Naphthalene誘導体による分離

まずはじめにdiastereomerへの誘導体化剤として naphthalene 誘導体2種 (Chart 2), すなわち (–) – α – methoxy – α – methyl – 1 – naphthaleneacetic acid (4b) および (–) – α – methoxy – α – methyl – 2 – naphthaleneacetic acid (5b) を合成し、HPLCにおけるそれらの有用性を吟味した。



これら試薬はラセミ体 (4a, 5a) として合成されるが、(+) – α – methylbenzylamineと

塩を形成させ分別結晶することにより (4b) および (5b) がいずれも 99.5% 以上の光学純度で得られた。また光学活性アミノ酸エステルとこれら試薬の縮合は DCC 法によりラセミ化することなく容易に進行した。このようにして調製した diastereomer を HPLC に付したところ、逆相型よりも順相型の方が遥かに優れた分離を与えた。一方、(4b) および (5b) による光学異性体の分離を比較すると、(4b) から誘導された diastereomer は (5b) からそれよりも分離度が大きく、アミン類の分離には (4b) の方が優れていることが判明した。GC においてはアミノ酸光学対掌体の溶出順序に規則性がみられるが、順相型 HPLC では diastereomer の溶出挙動にこのような規則性は認められなかった。

2) テルペン系 isothiocyanate 誘導体による分離

上述の naphthalene 誘導体はアミノ酸エステルの光学異性体分離試薬としてきわめて優れた結果を与えたが、これら誘導体化剤はラセミ体として得られるため試薬自体の光学分割が必要とされる。またアミノ酸エステルと試薬の縮合に DCC を用いることから尿素誘導体が副生し、これによるクロマトグラム上の妨害が懸念される。そのため、これらの欠点を改善する目的で天然物のテルペン誘導体を原料とし、(–)-1,7-dimethyl-7-norbornyl isothiocyanate (6) および (+)- α -neomenthyl isothiocyanate (7) (Chart 3) を合成した。ついでこれらの分離試薬としての有用性を吟味するとともに、これらから誘導される diastereomer のクロマトグラフ的挙動についても考察を加えた。



Chart 3

アミノ酸チオ尿素誘導体のメチルエステルは順相型 HPLC に付したとき光学対掌体の分離がやや不十分であった。しかし、エステル残基をかき高い tert-ブチルジメチルシリル基にすると各アミノ酸の光学対掌体はいずれも良く分離し、また光学対掌体相互の溶出順序も proline を例外として規則性を示した。

上述のクロマトグラフ的挙動からアミノ酸の α 位アルキル基とともにエステル残基が diastereomer の分離ならびに溶出順序に大きく影響することが明らかとなった。

審 査 結 果 の 要 旨

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、分離能に優れるばかりか、揮発性、熱安定性に乏しい極性化合物、高分子化合物も温和な条件で取り扱えるため、生体成分の好適な分析手段である。本研究は、HPLCのこのような特性を活かし、従来から分離、定量が困難とされている抱合型ステロイドの強心性ステロイドおよび胆汁酸を、また光学活性薬物のモデル化合物としてアミノ酸をとりあげ、信頼度の高い分析法の開発を試みたものである。

まず、日本産ガマの耳下腺分泌物に含まれる遊離型並びに抱合型強心性ステロイドの分離、定量を企て、標品を用い分離の諸条件を検討すると共に、化学構造と保持値の関係について考察を加えた。ついで、bufadinolide, cardenolide 24種をとりあげ、逆相型カラム μ Bondapak C₁₈ を用いて一斉分離の条件を確立したあと、ガマ毒液中のブホゲニンを検索し、13種を同定した。ついでブホトキシンのHPLC条件を吟味し、 μ Bondapak C₁₈ を用いる分析法を組み立て、ガマ毒液に含まれるブホトキシソ 20種を同定することに成功した。

つぎに遊離型並びに抱合型胆汁酸 15種についてHPLCによる分離条件を検討した。カラムに μ Bondapak C₁₈ を、移動相に 0.3%炭酸アンモニウム (pH 7.6)/アセトニトリルを用いるときcholate, ursodeoxycholate, chenodeoxycholate, deoxycholateおよびlithocholateが逆離型、グリシン並びにタウリン抱合型の各画分ごとに分離することを明らかにした。これら胆汁酸は抱合形式が異なってもほぼ同じ k' 値を示し、保持値はステロイド核上の水酸基の数、位置、立体配置に依存することが示唆された。ついで、ヒト胆汁への応用を目的として、Sephadex LH-20に疎水性基とイオン交換基を導入したpiperidinohydroxypropyl Sephadex LH-20を開発した。階段溶出により遊離型、グリシン並びにタウリン抱合型に3分画したのち、各画分をHPLCに付す胆汁酸 15種の一斉分析法を完成した。

最後にアミノ酸光学異性体の分離を目標として、diastereomerへの誘導体化剤をデザインし、(一) α -methoxy- α -methyl-1-および2-naphthaleneacetic acid 2種並びにテルペン系 isothiocyanate 誘導体 2種を合成した。DL-アミノ酸エステルから誘導されるdiastereomer は、順相型カラムを用いるHPLCでいずれも良好な分離を示した。

以上、本論文は分析化学の研究目標とする非破かい化学性の利用、微少差の弁別に、HPLCが有用な手法であることを実証したばかりか、臨床化学の場に画期的な方法論を提供したものであり、学位論文として十分価値ある内容と認める。